



Contents lists available at [Journal IICET](https://journal.iicet.org)

Southeast Asian Journal of technology and Science

ISSN: 2723-1151(Print) ISSN 2723-116X (Electronic)

Journal homepage: <https://jurnal.iicet.org/index.php/sajts>



Effect of adding fermented carrageenan fertilizer on chlorophyll and carotenoid content in *Chlorella vulgaris* semi mass-scale culture

Afra Hasna Fa'izah^{*}, Luthfiana Aprilianita Sari, Gunanti Mahasri

Aquaculture Study Program, Faculty of Fisheries and Marine, Airlangga University. Jl. Mulyorejo Kampus C UNAIR – Surabaya 60115. Phone (031) 5911451, Fax (031) 5965741

Article Info

Article history:

Received Jun 22th, 2023

Revised Aug 26th, 2023

Accepted Nov 03th, 2023

Keyword:

Klorofil

Karotenoid

Pupuk karagenan

Fermentasi

C. vulgaris

ABSTRACT

Mikroalga seperti *Chlorella* sp. memiliki kandungan klorofil dan karotenoid yang tinggi dan telah banyak digunakan sebagai pakan alami untuk ikan air laut dan air tawar. *Chlorella vulgaris* menghasilkan biomassa dengan cara kultur dan untuk hasil kelimpahan yang lebih banyak dilakukan kultur skala semi massal. Kultur *C. vulgaris* perlu memperhatikan kondisi lingkungannya, yaitu nutrisi pada media kulturnya dan kualitas air. Salah satu bahan yang dapat dijadikan sumber nutrisi adalah karagenan. Karagenan yang dipasarkan secara komersial mengandung jumlah N yang bervariasi dan mengandung P yang cukup tinggi, sehingga dapat menjadi alternatif pupuk yang pembuatannya dilakukan proses fermentasi dengan EM4. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh pemberian dan dosis terbaik pupuk karagenan yang difermentasi terhadap kandungan klorofil dan karotenoid pada kultur *C. vulgaris* skala semi massal. Penelitian ini menggunakan Uji ANOVA dan dilanjutkan Uji jarak berganda Duncan dengan 4 perlakuan dengan 5 kali ulangan, yaitu P1: kontrol menggunakan campuran pupuk kimia, P2: dosis 20 ppm pupuk karagenan yang difermentasi, P3: dosis 30 ppm pupuk karagenan yang difermentasi, dan P4: dosis 40 ppm pupuk karagenan yang difermentasi. Hasil penelitian menunjukkan berbeda nyata ($p < 0,05$) di hari kelima hingga kedelapan pada kandungan klorofil dengan hasil tertinggi pada perlakuan dosis 40 ppm sebesar 0,3085 µg/ml, serta hasil yang berbeda nyata di hari keempat hingga kedelapan pada kandungan karotenoid dengan hasil tertinggi pada perlakuan dosis 40 ppm yaitu sebesar 2,4586 µg/ml.



© 2023 The Authors. Published by IICET.

This is an open access article under the CC BY-NC-SA license
(<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0>)

Corresponding Author:

Afra Hasna Fa'izah.,

Airlangga University, Surabaya

Email: afra.hasna.faizah-2019@fpm.unair.ac.id

Pendahuluan

Pakan adalah salah satu faktor penting dalam budidaya untuk pertumbuhan, perkembangan, dan kelangsungan hidup ikan (Santoso *et al.*, 2018). Pakan alami seperti mikroalga banyak mendapatkan perhatian untuk digunakan sebagai pelengkap atau nutrisi tambahan dalam pakan buatan pada *aquafed* (Yulita, 2015) karena menyajikan komposisi nutrisi yang baik dan mendorong peningkatan respon imun ikan (Reyes-Becerril *et al.*, 2013; Sarker *et al.*, 2018). Mikroalga memiliki kandungan klorofil dan karotenoid yang tinggi (Shi *et al.*, 2017).

Klorofil a dan β -karoten dapat digunakan sebagai antioksidan karena dapat mereduksi radikal bebas, antivirus, dan antimikroba (Irawanto *et al.*, 2018). Karotenoid bertanggung jawab atas pigmentasi otot pada ikan konsumsi dan warna kulit pada ikan hias (Chavarría dan Flores, 2013) serta berfungsi untuk meningkatkan sistem kekebalan tubuh, menghasilkan ketahanan terhadap penyakit, kinerja pertumbuhan, kelangsungan hidup, dan peningkatan kualitas telur pada ikan budidaya tanpa menunjukkan efek samping atau sitotoksitas (Nakano dan Wiegertjes, 2020). Di antara berbagai spesies mikroalga, *Chlorella* sp. telah banyak digunakan sebagai pakan alami untuk ikan laut dan air tawar (Xu *et al.*, 2014).

Chlorella vulgaris adalah mikroalga uniseluler yang menggunakan CO₂ dan nutrisi untuk menghasilkan biomassa dengan cara kultur. Kultur *C. vulgaris* perlu memperhatikan kondisi lingkungannya, di antaranya adalah nutrisi pada media kulturnya serta kualitas air. Unsur yang dibutuhkan pada pertumbuhan *Chlorella* antara lain N (0,14-0,7 g/l) dan P (0,015-0,62 g/l) untuk pembentukan klorofil, karotenoid dan keperluan fotosintesis (Sumarlinah, 2000). Dengan tujuan mengurangi ketergantungan penggunaan pupuk kimia, maka dilakukan penelitian mengenai penggunaan pupuk cair organik yang berbahan dasar karagenan untuk kultur *C. vulgaris*.

Karagenan merupakan polisakarida linear bersulfat yang diekstraksi dari rumput laut merah tertentu kelas Rhodophyceae (Distantina dan Fahrurrozi, 2011). Karagenan yang dipasarkan secara komersial mengandung jumlah N yang bervariasi sekitar 0,01-0,5% dari berat menurut analisis Kjeldahl (King dan Lauterbach, 1987) dan mengandung P yang cukup tinggi (Rijoly *et al.*, 2020). Proses fermentasi dilakukan sebagai upaya untuk meningkatkan kandungan N dan P pada karagenan. Proses fermentasi menjadikan penyerapan nutrisi oleh organisme autotrof lebih mudah (Yumas *et al.*, 2019). Proses fermentasi meliputi dekomposisi biomassa organik dan meningkatkan pelepasan nutrisi yang tersedia (Vassileva *et al.*, 2021). EM4 Perikanan digunakan sebagai bioaktivator pada fermentasi pupuk organik cair dari karagenan. Melalui proses fermentasi, bioaktivator EM4 mempunyai pengaruh dalam penguraian senyawa kompleks menjadi senyawa sederhana (Yumas *et al.*, 2019).

Pemanfaatan pupuk karagenan yang difermentasi masih sulit ditemukan sehingga diharapkan penelitian ini dapat memberikan informasi yang bermanfaat di bidang perikanan. Berdasarkan uraian diatas, maka penelitian ini dilakukan untuk mengetahui pengaruh pemberian pupuk karagenan yang difermentasi terhadap kandungan klorofil dan karotenoid pada kultur *C. vulgaris* skala semi massal dengan dosis yang berbeda.

Tujuan dilakukannya penelitian ini adalah untuk mengetahui pengaruh serta dosis terbaik dari pupuk karagenan yang difermentasi terhadap kandungan klorofil dan karotenoid pada kultur *Chlorella vulgaris* skala semi massal.

Metode

Waktu dan Tempat

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan September sampai Oktober 2022. Kegiatan penelitian dilakukan di Laboratorium Basah Anatomi dan Budidaya serta Laboratorium Kimia dan Analisis Fakultas Perikanan dan Kelautan Universitas Airlangga Surabaya.

Alat dan Bahan

Alat-alat yang digunakan dalam persiapan penelitian ini adalah antara lain yaitu akuarium ukuran 20L, rak kultur, selang aerasi, batu aerasi, aerator LP60, kran aerasi, pipa, sambungan T pipa, tutup pipa, bor, selang besar, water pump dan profil tank. Pada pembuatan pupuk karagenan yang difermentasi memerlukan peralatan yaitu toples ukuran 5L, kertas saring, autoclave Hirayama Hve-50 dan erlenmeyer volume 2L. Peralatan yang digunakan untuk pengukuran kualitas air di antaranya adalah refraktometer, termometer, pH paper, dan lux meter. Sedangkan untuk pengukuran kandungan klorofil dan karotenoid menggunakan alat di antaranya adalah tabung reaksi Pyrex Iwaki 10 ml, 15 ml, dan 20 ml; tabung sentrifuge Onemed 10 ml; pipet ukur, pipet volume, gelas kimia, oven Memmert UN 55, sonikator ultrasonik Elmasonic, sentrifuge Hettich Rotanta 460R, kuvet, spektrofotometer, tisu, cotton bud dan hand glove.

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini yakni bibit *C. vulgaris* dari BPBAP Situbondo. Adapun bahan lainnya yang digunakan dalam penelitian dan pengukuran klorofil serta karotenoid antara lain yaitu urea, ZA, TSP, EDTA, FeCl₃, dan NPK; bubuk karagenan, larutan EM4 Perikanan, akuades, air laut, air tawar, sabun cuci, alkohol 70%, klorin, Na – thiosulfat, NaCl 0,9%, KOH 60%, ethanol 90%, dietil eter, dan aseton 90%.

Metode dan Rancangan Penelitian

Metode penelitian yang digunakan adalah metode eksperimental dengan Rancangan Acak Lengkap (RAL). Perlakuan pada penelitian ini yaitu sebanyak 4 perlakuan dengan 5 kali ulangan. Pada perlakuan 1 (P1) yaitu perlakuan kontrol menggunakan pupuk campuran Urea 70 ppm, ZA 40 ppm, TSP 40 ppm, EDTA 5 ppm, FeCl₃ 1 ppm, dan NPK 5 ppm dengan takaran pemberian disamakan dengan dosis pupuk walne yakni 1 ml/L (Irfiansyah, 2016); Perlakuan 2 (P2) yaitu pupuk karagenan yang difermentasi dengan EM4 dosis 20 ppm; perlakuan 3 (P3) yaitu pupuk karagenan yang difermentasi dengan EM4 dosis 30 ppm; dan perlakuan 4 (P4) yaitu pupuk karagenan yang difermentasi dengan EM4 dosis 40 ppm.

Prosedur Penelitian

Persiapan Penelitian

Tahap awal pada kultur semi massal dalam penelitian ini diawali dengan sterilisasi. Sterilisasi dalam kultur *C. vulgaris* skala semi massal terdiri atas sterilisasi peralatan, bahan penelitian dan media kultur yaitu air laut. Sterilisasi pada akuarium, selang aerasi, dan alat penunjang lainnya yaitu dengan mencuci menggunakan sabun kemudian dibilas sampai bersih dan dikeringkan. Sterilisasi akuarium dan selang aerasi juga dilakukan dengan perendaman. Perendaman alat tersebut menggunakan klorin 60 ppm dan dinetralkan menggunakan Na-Thiosulfat sebanyak 20 ppm. Sterilisasi juga dilakukan pada media kultur yaitu air laut. Air laut yang telah sesuai dengan salinitas yang optimal untuk pertumbuhan *C. vulgaris* kemudian disetrilkan dengan memberikan larutan klorin 60 ppm selama 24 jam dengan pemberian aerasi dan dinetralkan menggunakan Na-Thiosulfat 20 ppm.

Persiapan Pupuk Kontrol

Pupuk kontrol yang digunakan dalam penelitian yaitu terdiri dari campuran urea, ZA, TSP, EDTA, FeCl₃ dan NPK dengan dosis yaitu urea 70 ppm, ZA 40 ppm, TSP 40 ppm, EDTA 5 ppm, FeCl₃ 1 ppm dan NPK 5 ppm. Sebelum dicampurkan, terlebih dahulu dilakukan penimbangan masing-masing campuran pupuk. Kemudian melarutkan campuran pupuk tersebut dengan akuades 1 liter hingga homogen dan mencapai volume yang diinginkan. Penggunaan pupuk tersebut seperti yang digunakan pada kultur *Chlorella* sp. skala massal di BBPBAP Jepara (Irfiansyah, 2016).

Persiapan Pupuk Karagenan yang Difermentasi

Karagenan yang digunakan sebagai pupuk perlakuan menggunakan tepung karagenan. Karagenan dicampur dengan akuades yaitu 100 g karagenan dan 1000 ml akuades yang kemudian diberi larutan EM4 sebanyak 10% dari total volume larutan karagenan. EM4 digunakan sebagai bahan bioaktivator selama fermentasi. Bahan-bahan tersebut dicampur sampai rata di dalam toples kaca. Setelah tercampur, toples kaca ditutup hingga rapat kemudian difermentasi selama 3 minggu pada suhu ruang. Hasil fermentasi kemudian disaring menggunakan kertas saring ukuran 10 mikron dan hasil saringan dipindah ke tabung erlenmeyer untuk selanjutnya disterilisasi menggunakan *autoclave* dengan suhu 121°C selama 15 menit. Larutan pupuk yang sudah jadi selanjutnya disimpan pada wadah yang tertutup dan dalam keadaan dingin atau suhu rendah untuk mempertahankan kualitas pupuk. Pupuk karagenan yang telah difermentasi ini kemudian dilakukan analisis kandungan N dan P di Laboratorium Fakultas Kesehatan Masyarakat Universitas Airlangga.

Lingkungan dan Media Kultur

Lingkungan kultur *C. vulgaris* yang diharapkan dalam penelitian adalah pada salinitas optimalnya yaitu 25-28 ppt (Isnansetyo dan Kurniastuty, 1995), suhu optimum berkisar antara 28-35 °C (Chinnasamy *et al.*, 2009), dengan kondisi pH antara 7,0 - 8,5 (Wang *et al.*, 2010). dan menurut Oh-Hama *et al.* (1988) proses fotosintesis *Chlorella* sp. membutuhkan intensitas cahaya dengan rata-rata 3000-4000 lux.

Media kultur yang digunakan dalam penelitian ini yaitu air laut sebanyak 12 L dimasukkan dalam setiap akuarium yang berukuran 20 L dengan bibit *C. vulgaris* sebanyak 3 L. Setelah itu dilakukan pemberian dosis pupuk sesuai dengan perlakuan yang diberikan. Setelah pemberian pupuk maka media kultur diberi aerasi agar agitasi atau pengadukan udara dalam air merata sehingga *C. vulgaris* tidak mengendap.

Persiapan dan Penebaran Bibit

Bibit *C. vulgaris* yang digunakan dalam penelitian berasal dari Balai Perikanan Budidaya Air Payau (BPBAP) Situbondo. Volume bibit *C. vulgaris* untuk setiap akuariumnya adalah 20% dari volume total (Ditjen Perikanan Budidaya BPBBAP Situbondo, 2017). Sebelum dilakukan kultur, bibit *C. vulgaris* terlebih dahulu diaklimatisasi terhadap suhu di sekitar tempat kultur dengan diberi aerasi. Sebelum dilakukan penebaran, maka dilakukan penghitungan jumlah kepadatan awal populasi dari bibit *C. vulgaris* dengan cara mengambil sampel plankton

dari media stok dan menghitung di bawah mikroskop dengan *haemocytometer* dan dibantu dengan menggunakan *hand counter* untuk mempermudah penghitungan populasi sampel.

Pengukuran Kandungan Klorofil

Langkah pertama dalam mengukur kandungan klorofil adalah mengambil sampel hasil kultur *C. vulgaris* sebanyak 5 ml menggunakan pipet steril pada setiap perlakuan. Kemudian mencampurkan sampel hasil kultur *C. vulgaris* dengan aseton 90% dengan perbandingan 1:1 di dalam tabung reaksi 10 ml dan ditutup. Kemudian diultrasonik dalam sonikator selama ± 45 menit dengan suhu ruang. Hasil ultrasonik kemudian dipindahkan ke dalam tabung sentrifuge dan disentrifuge selama ± 30 menit dengan kecepatan 3500 rpm. Selanjutnya mengukur absorbansi dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 645 nm dan 663 nm (larutan standarnya adalah aseton 90%). Nilai data absorbansi kemudian dimasukkan ke dalam persamaan :

$$\begin{aligned}\text{Klorofil a } (\mu\text{g/ml}) &= 12.25 (A_{663}) - 2.55 \\ \text{Klorofil b } (\mu\text{g/ml}) &= 20.31 (A_{645}) - 4.91 \\ \text{Total klorofil } (\mu\text{g/ml}) &= 17.76 (A_{645}) + 7.34 (A_{663})\end{aligned}$$

Pengukuran Kandungan Karotenoid

Langkah awal dalam mengukur kandungan karotenoid adalah mengambil sampel hasil kultur *C. vulgaris* sebanyak 10 ml dengan menggunakan pipet steril pada setiap perlakuan. Sampel hasil kultur *C. vulgaris* kemudian disentrifuge selama 15 menit dengan kecepatan 3500 rpm. Endapan dipindahkan ke dalam tabung reaksi dan dikeringkan dalam oven pada suhu 70°C. Setelah endapan telah mengering, kemudian sampel diekstraksi dengan campuran 3 ml etanol, 6 tetes larutan kalium hidroksida 60% dan 3 ml larutan natrium klorida 0,9%. Campuran sampel diultrasonik dalam sonikator selama 15 menit dengan suhu ruang kemudian disentrifuge kembali dengan kecepatan 3500 rpm selama 15 menit. Supernatan yang dihasilkan ditambah 4 ml dietil eter, kemudian dikocok dan akan didapatkan dua lapisan, yaitu lapisan bawah berwarna hijau dan lapisan atas berwarna kuning. Supernatan yang berwarna kuning diukur absorbansinya pada panjang gelombang maksimum 450 nm dengan spektrofotometer. Masukkan data absorbansi ke dalam rumus :

$$\text{Karotenoid } (\mu\text{g/ml}) = (1000A_{450} - 3.27[\text{klorofil a}] - 104 [\text{klorofil b}]/227)$$

Pengukuran Kualitas Air

Pengukuran kualitas air dilakukan sehari sekali pada siang hari selama satu siklus (8 hari). Parameter kualitas air yang diukur diantaranya adalah salinitas, suhu, intensitas cahaya dan pH. Pengukuran salinitas dilakukan menggunakan *hand refraktometer*, pengukuran suhu dilakukan dengan termometer raksa, pengukuran intensitas cahaya dilakukan menggunakan luxmeter, dan pengukuran pada pH dilakukan dengan pH paper.

Hasil dan Pembahasan

Kandungan Klorofil

Hasil penelitian mengenai pemberian pupuk karagenan yang difermentasi pada kultur semi massal *C. vulgaris* diperoleh data kandungan klorofil sebagai berikut. Data hasil uji ANOVA dan uji Duncan dapat dilihat pada Tabel 1.

Hasil analisis ANOVA pada setiap perlakuan di hari pertama hingga hari keempat menunjukkan kandungan klorofil yang tidak berbeda nyata ($p > 0,05$). Sedangkan hari kelima hingga hari kedelapan menunjukkan hasil yang berbeda nyata ($p < 0,05$) yang kemudian dilanjutkan dengan uji jarak berganda Duncan.

Hasil rata-rata kandungan klorofil tertinggi adalah pada perlakuan pupuk karagenan 40 ppm (P4) yaitu sebesar 0,3085 $\mu\text{g/ml}$ kemudian dilanjutkan dengan perlakuan pupuk kimia (P1) sebesar 0,2533 $\mu\text{g/ml}$, perlakuan pupuk karagenan 30 ppm (P3) sebesar 0,2282 $\mu\text{g/ml}$, dan hasil terendah adalah pada pupuk karagenan 20 ppm (P2) yaitu 0,1429 $\mu\text{g/ml}$.

Tabel 1 <Data kandungan Klorofil *Chlorella Vulgaris* Skala Semi Massal ($\mu\text{g/ml}$)>

Hari	Perlakuan			
	Perlakuan 1 (kontrol)	Perlakuan 2 (20 ppm)	Perlakuan 3 (30 ppm)	Perlakuan 4 (40 ppm)
0	0,0676 $\pm$ 0,0286	0,0726 $\pm$ 0,0286	0,0726 $\pm$ 0,0336	0,0726 $\pm$ 0,0286
1	0,0575 $\pm$ 0,0251	0,0525 $\pm$ 0,0210	0,0425 $\pm$ 0,0286	0,0375 $\pm$ 0,0210
2	0,0676 $\pm$ 0,0286	0,0525 $\pm$ 0,0210	0,0525 $\pm$ 0,0210	0,0575 $\pm$ 0,0177
3	0,0977 $\pm$ 0,0286	0,0776 $\pm$ 0,0210	0,1027 $\pm$ 0,0210	0,0977 $\pm$ 0,0336

Hari	Perlakuan			
	Perlakuan 1 (kontrol)	Perlakuan 2 (20 ppm)	Perlakuan 3 (30 ppm)	Perlakuan 4 (40 ppm)
4	0,1128 ± 0,0327	0,0776 ± 0,0210	0,1278 ± 0,0210	0,1228 ± 0,0380
5	0,1981 ± 0,0286 ^b	0,1178 ± 0,0336 ^a	0,2031 ± 0,0210 ^b	0,1780 ± 0,0412 ^b
6	0,2533 ± 0,0372 ^b	0,1429 ± 0,0286 ^a	0,2282 ± 0,0210 ^b	0,3085 ± 0,0177 ^c
7	0,1630 ± 0,0327 ^b	0,0826 ± 0,0396 ^a	0,1881 ± 0,0572 ^b	0,2132 ± 0,0327 ^b
8	0,0525 ± 0,0210 ^a	0,0525 ± 0,0210 ^a	0,1278 ± 0,0210 ^b	0,0826 ± 0,0307 ^a

Keterangan : Superskrip berbeda dalam satu kolom menunjukkan perbedaan yang nyata ($p < 0,05$)

Kandungan Karotenoid

Hasil penelitian mengenai pemberian pupuk karagenan yang difermentasi pada kultur semi massal *C. vulgaris* diperoleh data kandungan karotenoid sebagai berikut. Data hasil uji ANOVA dan uji Duncan dapat dilihat pada Tabel 2.

Tabel 2 <Data Kandungan Karotenoid *Chlorella Vulgaris* Skala Semi Massal ($\mu\text{g/ml}$)>

Hari	Perlakuan			
	Perlakuan 1 (kontrol)	Perlakuan 2 (20 ppm)	Perlakuan 3 (30 ppm)	Perlakuan 4 (40 ppm)
0	2,2704 ± 0,0112	2,2685 ± 0,0098	2,2729 ± 0,0127	2,2685 ± 0,0098
1	2,2741 ± 0,0097	2,2628 ± 0,0144	2,2737 ± 0,0087	2,2659 ± 0,0101
2	2,2765 ± 0,0108	2,2681 ± 0,0070	2,2681 ± 0,0084	2,2662 ± 0,0052
3	2,2872 ± 0,0108	2,2683 ± 0,0106	2,2844 ± 0,0147	2,2740 ± 0,0158
4	2,2903 ± 0,0123 ^b	2,2727 ± 0,0079 ^a	2,2934 ± 0,0079 ^b	2,2865 ± 0,0143 ^{ab}
5	2,3858 ± 0,0108 ^{ab}	2,3765 ± 0,0127 ^a	2,4015 ± 0,0079 ^b	2,3934 ± 0,0155 ^{ab}
6	2,4398 ± 0,0140 ^b	2,4111 ± 0,0108 ^a	2,4185 ± 0,0079 ^a	2,4586 ± 0,0067 ^c
7	2,3418 ± 0,0123 ^{ab}	2,3589 ± 0,0149 ^{bc}	2,3676 ± 0,0216 ^c	2,3361 ± 0,0123 ^a
8	2,2778 ± 0,0079 ^a	2,2954 ± 0,0079 ^b	2,3066 ± 0,0079 ^b	2,2805 ± 0,0117 ^a

Keterangan : Superskrip berbeda dalam satu kolom menunjukkan perbedaan yang nyata ($p < 0,05$)

Hasil analisis ANOVA pada setiap perlakuan di hari pertama hingga hari ketiga menunjukkan kandungan karotenoid yang tidak berbeda nyata ($p > 0,05$). Sedangkan hari keempat hingga hari kedelapan menunjukkan hasil yang berbeda nyata ($p < 0,05$) yang kemudian dilanjutkan dengan uji jarak berganda Duncan.

Hasil rata-rata kandungan karotenoid tertinggi adalah pada perlakuan pupuk karagenan 40 ppm (P4) yaitu sebesar 2,4586 $\mu\text{g/ml}$ kemudian dilanjutkan dengan perlakuan pupuk kimia (P1) sebesar 2,4398 $\mu\text{g/ml}$, perlakuan pupuk karagenan 30 ppm (P3) sebesar 2,4185 $\mu\text{g/ml}$, dan hasil terendah adalah pada pupuk karagenan 20 ppm (P2) yaitu 2,4111 $\mu\text{g/ml}$.

Pembahasan

Berdasarkan uji ANOVA pada semua perlakuan menunjukkan hasil yang tidak berbeda nyata ($p > 0,05$) di hari kesatu hingga keempat pada kandungan klorofil dan di hari kesatu hingga ketiga pada kandungan karotenoid. Hasil uji ANOVA yang tidak berbeda nyata terjadi pada saat fase adaptasi. Kemampuan adaptasi pada *C. vulgaris* tersebut berkaitan dengan kondisi lingkungan habitatnya seperti sistem kultur yang dilakukan yaitu semi massal, kultur skala semi massal dilaksanakan di luar ruangan atau *semi-outdoor*. Pada kultur semi massal terdapat parameter lingkungan yang tidak dapat dikontrol sebagaimana pada kultur skala laboratorium seperti intensitas cahaya dan suhu ruang saat kultur sehingga dapat mempengaruhi lamanya masa adaptasi dari pertumbuhan mikroalga (Nainggolan *et al.*, 2018).

Uji ANOVA menunjukkan hasil yang berbeda nyata ($p < 0,05$) di hari kelima hingga kedelapan pada kandungan klorofil dan di hari keempat hingga kedelapan pada kandungan karotenoid. Hal tersebut dikarenakan telah optimalnya nutrisi yang diserap oleh *C. vulgaris* untuk menghasilkan klorofil dan karotenoid yaitu N dan P dari pupuk karagenan yang difermentasi. Boy *et al.* (2016) menyatakan bahwa pemberian nutrisi yang mendukung saat kultur membuat mikroalga dapat berfotosintesis sehingga berpengaruh terhadap pigmen klorofil dan karotenoid yang dihasilkan. Unsur N berfungsi sebagai senyawa yang memungkinkan digunakan mikroalga untuk menangkap energi sinar matahari melalui fotosintesis. Sedangkan P berfungsi untuk menyimpan dan mentransfer energi dalam bentuk ADP dan ATP (Riyono, 2007). Unsur P pada perairan dalam bentuk senyawa fosfat yang digunakan untuk fotosintesis mikroalga adalah ortofosfat.

Pigmen klorofil dan karotenoid terbentuk dari proses fotosintesis yang mana diawali dengan menghasilkan senyawa karbohidrat. Energi yang diperoleh dari fotosintesis dan metabolisme karbohidrat akan disimpan dan

ditransfer oleh fosfat dalam bentuk ATP. Lalu karbohidrat digunakan untuk proses respirasi menjadi asam piruvat, kemudian asam piruvat akan diubah menjadi asetil koenzim A yang selanjutnya masuk jalur mevalonat untuk pembentukan senyawa organik seperti klorofil, karotenoid, giberelin dan saponin (Peni dan Solichatun, 2004; Liferdi, 2010).

Hasil uji Duncan menunjukkan puncak tertinggi kandungan klorofil didapatkan pada perlakuan pupuk karagenan 40 ppm (P4) yaitu sebesar 0,3085 µg/ml. Hal ini dikarenakan N:P rasio yang diberikan melalui pemberian pupuk karagenan yang difermentasi cukup memenuhi kebutuhan hidup *C. vulgaris*. Berdasarkan hasil pengujian kandungan N dan P pada pupuk karagenan yang difermentasi, diperoleh nilai N sebesar 24,6 g/L dan P sebesar 8,4 g/L atau dengan N:P rasio sebesar 3:1, sedangkan kebutuhan N dan P pada *C. vulgaris* adalah 0,14-0,7 g/L dan 0,015-0,62 g/L atau N:P rasio sebesar 9:1 (Sumarlinah, 2000). Jika dibandingkan dengan literatur, maka rasio nutrisi yang terkandung dalam pupuk karagenan termasuk kurang dari nilai yang optimal. Namun, jika dibandingkan dengan rasio nutrisi pada dosis pupuk perlakuan lainnya maka P4 mempunyai rasio N:P yang lebih besar.

N:P rasio dalam media kultur yang digunakan dalam penelitian ini sangat berpengaruh terhadap kandungan klorofil. N merupakan bagian dari molekul klorofil yaitu $C_{55}H_{72}O_5N_4Mg$ (klorofil a) dan $C_{55}H_{70}O_6N_4Mg$ (klorofil b) sehingga N memiliki kaitan yang erat dengan sintesis klorofil. Sedangkan fungsi P selain berperan dalam mentransfer energi saat fotosintesis, juga merupakan bahan dasar pembentuk asam nukleat (Swandewi *et al.*, 2017). Agustini dan Kusmiati (2011) menyatakan bahwa unsur P untuk pertumbuhan mikroalga dibutuhkan dalam jumlah yang sedikit dan merupakan unsur pembatas bagi pertumbuhan serta perkembangan sel mikroalga. Swandewi *et al.* (2017) juga menerangkan bahwa konsentrasi P yang melebihi N akan menghambat proses asimilasi senyawa P bagi pertumbuhan mikroalga.

Selanjutnya berdasarkan hasil uji Duncan menunjukkan nilai kandungan klorofil terendah yaitu pada pupuk karagenan 20 ppm (P2) sebesar 0,1429 µg/ml. Hasil tersebut berkaitan dengan nutrisi yang diserap oleh *C. vulgaris*. Nutrisi seperti unsur N dan P dalam pupuk karagenan dosis 20 ppm (P2) memiliki konsentrasi yang rendah dibandingkan dengan perlakuan lainnya. Hal tersebut mempengaruhi kepadatan biomassa *C. vulgaris* yang akan berhubungan dengan kandungan klorofil yang dihasilkan. Jika biomassa mikroalga sedikit maka kandungan klorofil yang dihasilkan akan rendah. Hal tersebut didukung oleh pernyataan dari Hakalin *et al.* (2014), bahwa ketersediaan nutrisi berfungsi untuk pembelahan sel dan proses metabolisme sel, jika nutrisi seperti N dan P terbatas dalam suatu media kultur maka akan menyebabkan terjadinya penurunan jumlah sel mikroalga secara terus menerus. Serta pernyataan dari Garini *et al.* (2021), bahwa semakin tinggi kelimpahan mikroalga, maka akan semakin tinggi nilai klorofil yang menggambarkan biomassa mikroalga. Sehingga penambahan biomassa sejalan dengan peningkatan kandungan klorofilnya.

Hasil uji Duncan menunjukkan puncak tertinggi kandungan karotenoid adalah pada perlakuan pupuk karagenan 40 ppm (P4) yaitu sebesar 2,4586 µg/ml. Hal ini dikarenakan bentuk kandungan N dan P pada pupuk yang diberikan telah sesuai dengan kebutuhan dan mampu diserap oleh *C. vulgaris*, yaitu kandungan N dalam bentuk nitrit, nitrat dan amonia serta kandungan P dalam bentuk fosfat (ortofosfat). Pupuk yang digunakan dalam penelitian yaitu karagenan yang telah melalui proses fermentasi. Proses fermentasi bahan yang akan dijadikan pupuk bertujuan agar penyerapan nutrisi oleh organisme autotrof lebih mudah (Yumas *et al.*, 2019), yang meliputi dekomposisi biomassa organik sehingga meningkatkan pelepasan nutrisi yang tersedia (Vassileva *et al.*, 2021).

Proses fermentasi pada pembuatan pupuk karagenan menggunakan bantuan bakteri dari produk EM4 Perikanan yang mempunyai pengaruh dalam penguraian senyawa kompleks menjadi senyawa yang sederhana dan meningkatkan kualitasnya (Nur *et al.*, 2016; Yumas *et al.*, 2019). EM4 Perikanan mengandung *Lactobacillus casei* yang berperan dalam menguraikan laktosa secara cepat menjadi asam-asam organik dan gas anaerobik dengan menggunakan enzim laktase, serta *Saccharomyces cerevisiae* yang mampu menghasilkan enzim zymase untuk mempercepat fermentasi bahan organik (Munawaroh *et al.*, 2013; Herdiana dan Soedjono, 2021).

Mikroorganisme yang terdapat pada EM4 perikanan menghasilkan enzim protease (Herdiana dan Soedjono, 2021). Dimulai dari senyawa protein yang dihidrolisis dengan bantuan air dan enzim protease sehingga terpecah menjadi asam karboksilat dan asam amino. Kemudian melalui proses nitrifikasi, enzim protease berperan dalam reaksi yang melibatkan pemecahan protein di antaranya menjadi amonia (NH_3), nitrit (NO_2), nitrat (NO_3), CO_2 , H_2O (Fitria *et al.*, 2008; Purwosasmito, 2016). EM4 juga mengandung bakteri pelarut fosfat yang berfungsi untuk membantu melarutkan fosfat dalam bahan organik dengan memanfaatkan ATP untuk mengubah glukosa menjadi glukosa 6-fosfat yang selanjutnya dirombak kembali menjadi glukosa dan fosfat (bentuk paling sederhananya yaitu ortofosfat) (Santi, 2008; Sari dan Alfianita, 2019). Pupuk karagenan yang difermentasi ini dapat mengurangi ketergantungan terhadap penggunaan pupuk kimia karena kandungan nutrisinya yang sesuai dan dapat diserap *C. vulgaris* serta harganya yang terjangkau dibandingkan dengan pupuk kimia.

Kemudian berdasarkan hasil uji Duncan menunjukkan nilai kandungan karotenoid terendah yaitu pada pupuk karagenan 20 ppm (P2) sebesar 2,4111 µg/ml. Menurut Sadiman (2016), pertumbuhan dan pembentukan karotenoid pada mikroalga dipengaruhi oleh beberapa faktor lingkungan, diantaranya seperti intensitas cahaya dan nutrisi. Jika semakin banyak intensitas cahaya yang diserap selama fotosintesis, spektrum karotenoid menjadi lebih terlihat dan warna merahnya meningkat. Sedangkan pembatasan nutrisi merangsang sintesis astaxanthin ketika pembelahan sel diperlambat. Pembelahan sel yang diperlambat terjadi akibat adanya respon terhadap kondisi yang tidak menguntungkan, hal ini dilakukan karena pengeluaran metabolit sekunder adalah bagian dari mekanisme pertahanan yang dilakukan oleh mikroalga.

Faktor pembentukan klorofil dan karotenoid pada *C. vulgaris* juga dipengaruhi oleh kondisi lingkungan media pemeliharaan. Kondisi lingkungan seperti kualitas air di antaranya adalah salinitas, suhu, pH, dan intensitas cahaya akan mendukung pertumbuhan serta pembentukan klorofil dan karotenoid pada *C. vulgaris*. Salinitas selama pemeliharaan berkisar antara 30 – 70 ppt. Menurut Prabowo (2009), *Chlorella* air laut dapat tumbuh dengan baik pada salinitas 15-35 ppt. Pengukuran suhu pada saat penelitian didapatkan hasil antara 26-30°C. Sharma *et al.* (2012) menyatakan bahwa *C. vulgaris* menghasilkan pertumbuhan yang lebih baik dengan tingginya kandungan biokimia dan komposisi nutrisi yang baik yaitu tumbuh pada suhu antara 25-30 °C. Kemudian pH pada media kultur *C. vulgaris* selama masa pemeliharaan yaitu 7 yang merupakan kisaran normal bagi pertumbuhan *C. vulgaris*. pH optimal untuk pertumbuhan sebagian besar spesies mikroalga berkisar antara 7 - 9 (Blinová *et al.*, 2015). Intensitas cahaya pada saat penelitian kultur *C. vulgaris* ini berada pada kondisi *semi-outdoor* yang didapatkan hasil pengukuran berkisar antara 450 – 910 lux. Hasil pengukuran tersebut kurang optimal untuk kultur *C. vulgaris*. Seyfabadi *et al.* (2011) menyatakan bahwa intensitas cahaya merupakan faktor yang sangat penting terkait dengan produksi dan efisiensi organisme fotosintetik. Ketika organisme fotosintetik tidak memiliki sumber karbon organik, cara utama mereka memperoleh energi adalah melalui cahaya, yang dengan meningkatnya intensitas cahaya, maka produk yang dihasilkan dari fotosintesis juga meningkat.

Simpulan

Hasil penelitian tentang pengaruh pemberian pupuk karagenan yang difermentasi terhadap kandungan klorofil dan karotenoid *C. vulgaris* dapat disimpulkan bahwa pemberian pupuk karagenan yang difermentasi berpengaruh terhadap kandungan klorofil dan karotenoid pada kultur *C. vulgaris* skala semi massal yang berbeda nyata ($p < 0,05$) pada hari kelima hingga kedelapan dan pada hari keempat hingga kedelapan. Dosis terbaik penggunaan pupuk karagenan yang difermentasi terhadap kandungan klorofil dan karotenoid pada kultur *C. vulgaris* skala semi massal adalah 40 ppm dengan hasil tertinggi untuk kedua parameter tersebut yaitu klorofil sebesar 0,3085 µg/ml dan karotenoid sebesar 2,4586 µg/ml.

Referensi

- Agustini, N. W. S. dan Kusmiati. 2011. Variasi Penambahan KH₂PO₄ sebagai Sumber Fosfat Terhadap Pembentukan Karotenoid dan β-karoten *Dunaliella salina*. Seminar Nasional Kimia dan Pendidikan Kimia III (SN-KPK III). Hal 835-845.
- Blinová, L., A. Bartošová and Gerulová, K. 2015. Cultivation of Microalgae (*Chlorella vulgaris*) for Biodiesel Production. Research Papers Faculty of Materials Science and Technology Slovak University of Technology, 23 (36): 87-95.
- Boy, F., W. F. Ma'ruf dan Sumardianto, S. 2016. Pengaruh Umur Panen dan Lama Penyimpanan Mikroalga *Chlorella* sp. Terhadap Kestabilan Klorofil Setelah Fiksasi Mgco₃. Jurnal Pengolahan dan Bioteknologi Hasil Perikanan, 5 (2): 10-15.
- Chavarria, M. G. and Flores, M. L. 2013. The Use of Carotenoid in Aquaculture. Research Journal of Fisheries and Hydrobiology, 8 (2): 38-49.
- Chinnasamy, S., B. Ramakrishnan., A. Bhatnagar and K. C. Das. 2009. Biomass Production Potential of a Aastewater alga *Chlorella vulgaris* ARC 1 Under Elevated Levels of CO₂ and Temperature. International journal of molecular sciences, 10(2): 518-532.
- Direktorat Jendral Perikanan Budidaya Balai Perikanan Budidaya Air Payau Situbondo. 2017. Petunjuk Teknis Produksi Phytoplankton. Situbondo. Direktorat Jendral Perikanan Budidaya Balai Perikanan Budidaya Air Payau Situbondo.
- Distantina, S. and M. Fahrurrozi. 2011. Carrageenan Properties Extracted from *Eucheuma cottonii*, Indonesia. International Journal of Chemical and Molecular Engineering, 5 (6): 501-505.

- Fitria, Y., B. Ibrahim dan D. Desniar. 2008. Pembuatan Pupuk Organik Cair dari Limbah Cair Industri Perikanan Menggunakan Asam Asetat dan EM4 (Effective Microorganisme 4). *Akuatik: Jurnal Sumberdaya Perairan*, 2 (1).
- Garini, B. N., J. Suprijanto dan I. Pratikto. 2021. Kandungan klorofil-a dan Kelimpahan di perairan Kendal, Jawa Tengah. *Journal of Marine Research*, 10 (1): 102-108.
- Hakalin, N. L., A. P. Paz., D. A. Aranda and L. M. P. Moraes. 2014. Enhancement of Cell Growth and Lipid Content of a Freshwater Microalga *Scenedesmus* sp. by Optimizing Nitrogen, Phosphorus and Vitamin Concentrations for Biodiesel Production. *Natural Science*, 6 (1): 1044-1054.
- Herdiana, V. dan E. S. Soedjono. 2021. Efek EM4 Pada Penguraian Lumpur Tinja Secara Anaerobik. *Jurnal Teknik ITS*, 10 (2): 142-149.
- Irawanto, Y. E., U. Yanuhar and A. Kurniawan. 2018. In-Vivo Test of *Spirulina* sp. as Inducer of B-Actin in Cantang Grouper (*Epinephelus fuscoguttatus-lanceolatus*) Infected by Viral Nervous Necrosis. *JFMR (Journal of Fisheries and Marine Research)*, 2 (3): 225-234.
- Irfiansyah, M. R. 2016. Teknik Kultur *Chlorella* sp. Skala Massal Untuk Pakan *Rotifera* sp. dan Starter Tambak di BBPAP Jepara, Jawa Tengah. Universitas Airlangga.
- Isnansetyo, A. dan Kurniastuty. 1995. Teknik Kultur Phytoplankton dan Zooplankton. Kanisius. Yogyakarta. Hal 34-85.
- King, G. M. and G. E. Lauterbach. 1987. Characterization of Carrageenan Nitrogen Content and Its Susceptibility to Enzymatic Hydrolysis. *Botanica Marina*, 30: 33-39.
- Liferdi, L. 2010. Efek Pemberian Fosfor terhadap Pertumbuhan dan Status Hara pada Bibit Manggis. *J. Hort*, 20 (1): 18-26.
- Munawaroh, U., M. Sutisna dan K. Pharmawati. 2013. Penyisihan Parameter Pencemar Lingkungan Pada Limbah Cair Industri Tahu Menggunakan Efektif Mikroorganisme 4 (EM4) Serta Pemanfaatannya. *Jurnal Reka Lingkungan*, 1 (2): 93-104.
- Nainggolan, J. G. M., A. Tanjung and I. Effendi. 2018. Growth of *Spirulina platensis* in Indoor and Semi Outdoor Culturing Systems. *Asian Journal of Aquatic Sciences*, 1 (1) : 22-28.
- Nakano, T. and G. Wiegertjes, G. 2020. Properties of Carotenoids in Fish Fitness: a review. *Marine Drugs*, 18 (11): 568.
- Nur, T., A. R. Noor dan M. Elma. 2016. Pembuatan Pupuk Organik Cair dari Sampah Organik Rumah Tangga Dengan Bioaktivator EM4 (Effective microorganisms). *Konversi*, 5 (2): 44-51.
- Oh-Hama, T., Miyachi, S. 1988. *Chlorella*. In M. A. Borowitzka and L. J. Borowitzka (eds.). *Microalgal Biotechnology*. Cambridge University Press. Cambridge. Hal 3-26.
- Peni, D. K. dan A. E. Solichatun. 2004. Pertumbuhan, Kadar Klorofil-Karotenoid, Saponin, Aktivitas Nitrat reduktase Anting-anting (*Acalypha indica* L.) pada Konsentrasi Asam Giberelat (GA3) yang Berbeda. *Biofarmasi*, 2 (1): 1-8.
- Prabowo, D. A. 2009. Optimasi Pengembangan Media untuk Pertumbuhan *Chlorella* sp. pada skala laboratorium. Skripsi. Program Studi Ilmu dan Teknologi Kelautan Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, IPB. Hal 57.
- Purwosasmitho, L. 2016. Pengaruh Konsentrasi Effective Microorganisme 4 (Em4) Dan Suhu Hidrolisis Air Sisa Pencucian Surimi Terhadap Kandungan Makronutrien Hidrolisat Protein. Doctoral dissertation. Universitas Brawijaya. Malang. 91 hal.
- Reyes-Becerril, M., F. Guardiola., M. Rojas., F. Ascencio-Valle and M. Á. Esteban. 2013. Dietary Administration of Microalgae *Navicula* sp. Affects Immune Status and Gene Expression of Gilthead Seabream (*Sparus aurata*). *Fish & shellfish immunology*, 35 (3): 883-889.
- Riyono, S. H. 2006. Beberapa Metode Pengukuran Klorofil Mikroalga di Laut. *Jurnal Oseana*, 31 (3): 33-44.
- Sadiman, E. K. 2016. Pengaruh Salinitas Terhadap Pertumbuhan dan Kandungan Astaxanthin Mikroalga *Botryococcus braunii*. Doctoral dissertation. UIN Sunan Gunung Djati Bandung. Bandung.
- Santoso, B., L. Santoso and T. Tarsim. 2018. Optimization of Maggot *Hermetia illucens* Combination with Artificial Feed Against Growth and Survival Rate of Mad Barb Fish (Bleeker, 1851). *Berkala Perikanan Terubuk*, 46 (3): 10-19.
- Sari, M. W. dan S. Alfianita. 2019. Pemanfaatan Batang Pohon Pisang Sebagai Pupuk Organik Cair dengan Aktivator EM4 dan Lama Fermentasi. *Jurnal TEDC*, 12 (2): 133-138.
- Sarker, P. K., A. R. Kapuscinski., A. Y. Bae., E. Donaldson., A. J. Sitek., D. S. Fitzgerald and O. F. Edelson. 2018. Towards Sustainable Aquafeeds: Evaluating Substitution of Fishmeal with Lipid-extracted Microalgal Co-product (*Nannochloropsis oculata*) in Diets of Juvenile Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *PLoS One*, 13 (7): 0201315.
- Seyfabadi, J., Z. Ramezanpour and Z. Amini Khoeyi. 2011. Protein, Fatty Acid, and Pigment Content of *Chlorella vulgaris* Under Different Light Regimes. *Journal of Applied Phycology*, 23 (4): 721-726.

- Sharma, R., G. P. Singh and V. K. Sharma. 2012. Effects of culture conditions on growth and biochemical profile of *Chlorella vulgaris*. *Journal of Plant Pathology and Microbiology*, 3 (5): 1-6.
- Shi, X., Z. Luo., F. Chen., C. C. Wei., K. Wu., X. M. Zhu and X. Liu. 2017. Effect of Fish Meal Replacement by *Chlorella* Meal with Dietary Cellulase Addition on Growth Performance, Digestive Enzymatic Activities, Histology and Myogenic Genes Expression for Crucian Carp *Carassius auratus*. *Aquaculture Research*, 48 (6): 3244-3256.
- Sumarlinah. 2000. Hubungan Komunitas Mikroalga dan Unsur Hara N dan P di Danau Sunter Selatan Jakarta Utara. Skripsi. Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan Institut Pertanian Bogor, Bogor. 49 hal.
- Swandewi, I. G. A. P. A. P., A. A. M. D. Anggreni dan B. Ahmadi. 2017. Pengaruh Penambahan NaNO₃ dan K₂HPO₄ pada Media BG-11 Terhadap Konsentrasi Biomassa dan Klorofil *Tetraselmis chuii*. *Jurnal Rekayasa*, 5 (1): 1-11.
- Vassileva, M., E. Malusà., L. Sas-Paszt., P. Trzcinski., A. Galvez., E. Flor-Peregrin., S. Shilev., L. Canfora., S. Mocali and N. Vassilev. 2021. Fermentation Strategies to Improve Soil Bio-inoculant Production and Quality. *Microorganisms*, 9 (6): 1254.
- Wang, C., Li, H., Q. Wang and P. Wei. 2010. Effect of pH on Growth and Lipid Content of *Chlorella vulgaris* Cultured in Biogas Slurry. *Sheng wu gong cheng xue bao= Chinese journal of biotechnology*, 26 (8): 1074-1079.
- Xu, W., Z. Gao., Z. Qi., M. Qiu., J. Q. Peng and R. Shao. 2014. Effect of Dietary *Chlorella* on the Growth Performance and Physiological Parameters of Gibel Carp, *Carassius auratus* gibelio. *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 14 (1).
- Yulita E. 2015. Substitusi *Chlorella vulgaris* Hasil Isolasi dari Limbah Cair Industri Karet Sebagai Pakan Ikan Nila (*Oreochromis niloticus*). *Jurnal Dinamika Penelitian Industri*. 26 (2): 131-138.
- Yumas, M., J. E. Loppies., E. Y. Ristanti dan D. W. Asriati. 2019. Pemanfaatan Limbah Padat (*Eucheuma* sp.) Industri Pengolahan Semi-Refined Karagenan Sebagai Pupuk Cair Pada Tanaman Hortikultura. *Jurnal Industri Hasil Perkebunan*, 14 (2): 67-82.